

氏 名	藤田 弘幸
学 位 の 種 類	博士（創薬科学）
学 位 記 番 号	甲第12号
学位授与の日付	平成 27 年 3 月 23 日
学位授与の要件	課程博士（学位規則第4条第1項）
学位授与の題目	骨関節系疾患に関与する因子の遺伝薬理学的研究

論 文 審 査 委 員	主査	檜井 栄一
	副査	玉井 郁巳
	副査	松下 良
	副査	加藤 将夫
	副査	米田 幸雄

学位論文要旨

An intensive study has not been performed to reveal pivotal role of paired box (Pax) family proteins in osteoblastogenesis so far. We, in this study, investigated the possible involvement of Pax5 in mechanisms underlying the regulation of differentiation and maturation of osteoblasts. The knockdown of Pax5 markedly reduced not only alkaline phosphatase activity but promoter activities of both *Osterix* and *Osteocalcin* in osteoblasts. In transgenic mice expressing Pax5 in osteoblasts by using the mouse *$\alpha 1(I)$ Collagen* promoter, a high bone mass phenotype was seen due to the increased bone formation rate. Moreover, ovariectomy (OVX) significantly reduced bone volume in wild-type (WT) mice without significantly affecting that in Pax5 transgenic mice. These results suggest that Pax5 is one of the pivotal transcription factors controlling osteoblastogenesis and bone remodeling under physiological and pathological conditions.

【背景・目的】

骨格系は、脊椎動物の最も基本的な特徴であり、その構造は力学的にも適応した形態を持ち、器官の保護、生体の支持、運動機能の維持に必須の役割を果たしている。骨は軟骨内骨化により新生し、その成長が停止した後も、骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収が絶えず繰り返され、再構築(リモデリング)を営むことにより骨の形態や機能が維持されている。通常の骨リモデリングでは、骨格系の質及び量は骨吸収と骨形成の間に平衡関係が保たれることにより維持されるが、閉経や加齢など様々な要因から、一旦これらのバランスが破綻すると骨粗鬆症に代表される様々な骨代謝性疾患が発症する。現在、日本における骨粗鬆症患者数は 1,100 万人を超えると推定されており、患者の QOL 向上のためにも新規の作用機序を有する治療薬の開発が骨粗鬆症対策の早急な課題である。

一方、我々はこれまで、「骨代謝を調節する新規転写制御因子」の探索を行ってきた。今回我々が特に着目したのは Paired box(Pax)ファミリー転写制御因子である。これまでに、いくつかの Pax ファミリー全身欠損マウスにおいて明らかな骨格異常が見られるという報告がなされてきた。しかしながらこれらの報告においては、骨リモデリングにおける Pax ファミリーの詳細な役割についてはほとんど言及されていない。そこで本研究では *in vitro* と *in vivo* の実験手技を用いて、骨形成と骨リモデリングに関与する骨芽細胞に特に着目し、骨芽細胞における Pax ファミリーの詳細な役割を明らかにすることを目的とした。

【方法】

①in vitro における解析

Pax family の発現解析：マウス初代培養骨芽細胞において Pax family mRNA の発現を real-time PCR 法を用いて解析を行った。またマウス胎児脛骨組織における Pax5 の発現を、免疫組織化学法を用いて解析した。

Pax5 ノックダウンによる骨芽細胞分化への影響：Pax5 siRNA をマウス骨芽細胞株 MC3T3-E1 へ導入した。Pax5 ノックダウンの骨芽細胞分化への影響を評価するため、alkaline phosphatase (ALP)活性の測定、および骨芽細胞分化マーカーや転写制御因子の mRNA 発現を real-time PCR 法を用いて解析した。

Pax5 安定過剰発現細胞を用いた解析：Pax5 安定過剰発現細胞を作成し、分化誘導後、ALP 活性の測定、Ca²⁺蓄積量の測定、von Kossa 染色を行った。また骨芽細胞分化マーカーや転写制御因子の mRNA 発現を real-time PCR 法を用いて解析した。

Pax5 の骨芽細胞関連遺伝子転写活性への影響：Pax5 のノックダウンあるいは過剰発現を行った細胞を用いて、骨芽細胞分化マーカーや転写制御因子のプロモーター活性を luciferase アッセイにより解析した。また chromatin immunoprecipitation (ChIP)アッセイにより、Pax5 の各種遺伝子プロモーターへの結合を調べた。

②in vivo における解析

骨芽細胞特異的 Pax5 トランスジェニック(Pax5-Tg)マウスの骨表現型解析：Pax5-Tg マウスを作成し、8 週齢の時点で脊椎及び脛骨を取り出し、固定・包埋後切片を作成した。作成した切片から骨量測定や骨形成率など骨形態計測を行った。

卵巣摘出術(OVX)を行った Pax5-Tg マウスの骨表現型解析：8 週齢雌性野生型(WT)および Pax5-Tg マウスに OVX を行い、閉経後骨粗鬆症モデルマウスを作成した。術後 4 週間目に脊椎を取り出し、固定・包埋後切片を作成した。作成した切片から骨量測定や骨形成率など骨形態計測を行った。

【結果】

①in vitro における解析

Pax family の発現解析：マウス初代培養骨芽細胞において Pax family のうち Pax3、Pax5、Pax9 の発現が確認された。また、マウス脛骨において免疫組織化学法を用いて Pax5 の発現を解析したところ、海綿骨に隣接した骨芽細胞において強いシグナルが観察された。

Pax5 ノックダウンによる骨芽細胞分化への影響：Control siRNA 導入群と比較して、Pax5 siRNA 導入群では ALP 染色性の顕著な減少が観察された。また、Pax5 siRNA 導入群では、Osteocalcin、 $\alpha(I)$ Collagen 及び Osterix の発現の有意な減少が認められたが、Runx2 の発現には変化は認められなかった。

Pax5 安定過剰発現細胞を用いた解析：Pax5 安定発現細胞群では ALP 活性と Ca²⁺蓄積量ともに各培養日数において有意な上昇が認められた。von Kossa 染色においても Pax5 安定発現細胞群では著明な染色性の増加が観察された。また、Osteocalcin、 $\alpha(I)$ Collagen 及び Osterix の発現は、Pax5 安定発現細胞群において有意な上昇が認められた。

Pax5 の骨芽細胞関連遺伝子転写活性への影響：Control siRNA 導入群と比較して、Pax5 siRNA 導入群では Osteocalcin、及び Osterix のプロモーター活性の有意な減少が認められたが、 $\alpha(I)$ Collagen 及

び *Runx2* のプロモーター活性に変化は認められなかった。*Pax5* 発現ベクターを導入したところ、empty vector (EV)導入群に比べ *Pax5* 発現ベクター導入群において、*Osteocalcin* 及び *Osterix* のプロモーター活性の有意な上昇が認められた。また *in silico* 解析の結果から、*Osteocalcin* 及び *Osterix* のプロモーター上に *Pax5* putative binding site の存在が推測されたため、結合サイトを挟むような primer を設計し、抗 *Pax5* 抗体を用いた ChIP assay を行った。その結果、*Osteocalcin* 及び *Osterix* どちらのプロモーター上においても数ヶ所においてシグナルが確認された。

②in vivo における解析

骨芽細胞特異的 *Pax5* トランスジェニック (*Pax5*-Tg)マウスの骨表現型解析: *Pax5*-Tg マウスを作成し 8 週齢の時点で解剖を行い、骨表現型解析を行った。その結果、WT マウスに比べ *Pax5*-Tg マウスの脊椎および脛骨において骨量の著明な増加が観察された。また骨形態計測の結果、WT マウスに比べ *Pax5*-Tg マウスの脊椎において、骨形成パラメーター及び骨吸収パラメーターの有意な上昇が認められた。

卵巣摘出術(OVX)を行った *Pax5*-Tg マウスの骨表現型解析: OVX 処置後 4 週間後に骨表現型解析を行った。子宮重量を測定した結果、WT マウスと *Pax5*-Tg マウスどちらにおいても、偽手術(Sham)処置群と比べその値は有意に減少していたため OVX は正しく成功していることを確認した。また脊椎切片を用いて骨量を測定した結果、WT マウスでは OVX 処置による骨量の有意な減少が認められたが、*Pax5*-Tg マウスでは OVX 群において骨量の減少は認められなかった。また骨形態計測の結果、WT マウスあるいは *Pax5*-Tg マウスのどちらのマウスにおいても、Sham 処置群と OVX 処置群の間で骨形成パラメーターに有意な変化は認められなかった。続いて、WT マウスにおいて、Sham 処置群と比較すると OVX 処置群では骨吸収パラメーターに有意な上昇が認められたが、*Pax5*-Tg マウスにおいては Sham 処置群と OVX 処置群の間で有意な差は認められなかった。

【考察】

本研究結果より、転写制御因子 *Pax5* は骨芽細胞に機能的に発現しており、*Runx2* 非依存的な経路で、骨形成と骨リモデリングにおいて骨芽細胞分化・骨芽細胞成熟化を促進的に調節することが明らかとなった。また骨粗鬆症病態時の骨リモデリングにおいても *Pax5* が関与する可能性が示唆された。骨芽細胞分化のマスターレギュレーターである *Runx2* をターゲットとした薬剤すら骨形成促進剤としては現在存在しないという現状を考えると、骨芽細胞において骨形成を制御する *Runx2* 以外の別の因子を発見することが、将来骨形成促進剤の開発に役立つ可能性が考えられる。今回の研究結果が、骨粗鬆症、あるいは骨芽細胞の異常分化や成熟と関連している様々な代謝性骨疾患の新規治療の礎となり、新たな展望をもたらすことを期待したい。

審査結果の要旨

本研究では、骨形成に関与する骨芽細胞における Paired box (Pax)ファミリー転写制御因子の機能的役割を *in vitro* および *in vivo* の両面から明らかにすることを目的とした。培養骨芽細胞において Pax ファミリーの発現解析とその機能解析を行った。Pax ファミリーのうち *Pax3*、*Pax5*、*Pax9* の発現が確認された。また、*Pax5* のノックダウンにより骨芽細胞の分化が抑制され、一方 *Pax5* の過剰発現により同細胞の分化が亢進した。つづいて骨芽細胞特異的 *Pax5* 発現(*Pax5-Tg*)マウスを作製し、その表現型を解析した。野生型(WT)マウスに比べ *Pax5-Tg* マウスの脊椎および脛骨において骨量の有意な上昇が認められた。また、WT マウスでは卵巣摘出处置による骨量の有意な減少が認められたが、*Pax5-Tg* マウスでは疑似処置群と卵巣摘出群の間に骨量の著明な差は認められなかった。本研究結果より、転写制御因子 *Pax5* は骨芽細胞に機能的に発現しており、骨形成過程および骨粗鬆症病態時の骨リモデリング過程において骨芽細胞分化・成熟化を促進的に調節することが明らかとなった。

以上の研究成績は、骨粗鬆症を含む、骨芽細胞の異常分化や成熟と関連している様々な代謝性骨疾患の新規治療法・治療薬開発の礎となることが期待される点で評価されるため、審査委員会は本論文が博士（創薬科学）に値すると判断した。